

**INTERKONVERTIERUNG DES
PYRUVATDEHYDROGENASE KOMPLEXES
IN INTAKTER LEBER UND IHRE
PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG**

Christoph Patzelt

1972

Aus der FORSCHERGRUPPE DIABETES in München, Kölner Platz 1
Gemeinsame Leitung: Prof. Dr. O. Wieland und Prof. Dr. H. Mehnert

INTERKONVERTIERUNG DES PYRUVATDEHYDROGENASE KOMPLEXES IN
INTAKTER LEBER UND IHRE PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG

Inaugural-Dissertation
zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München



vorgelegt von
CHRISTOPH PATZELT

aus

Gleiwitz

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof.Dr.O.Wieland
Coreferent: Prof.Dr.Dr.h.c.T.Bücher
Dekan: Prof.Dr.W.Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 5.12.1972



ABKÜRZUNGEN

PDH:	Pyruvatdehydrogenase
PDH _a :	Aktive, d.h. dephosphorylierte Form der Pyruvatdehydrogenase
PDH _b :	Inaktive, d.h. phosphorylierte Form der Pyruvatdehydrogenase
NAD ⁺ :	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH:	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduzierte Form
TPP:	Thiaminpyrophosphat
CoASH:	Coenzym A
LDH:	Lactatdehydrogenase

TEIL I

AKTIVE UND INAKTIVE FORM DER PYRUVATDEHYDROGENASE IN DER RATTENLEBER

Einfluß von Hunger und Wiederfütterung und von Insulinbehandlung auf die Interkonversion der Pyruvatdehydrogenase

Die aktive Form der Pyruvatdehydrogenase (PDH) ist die katalytisch aktive Form des Enzyms, die für die Oxidation von Pyruvat zu Acetyl-CoA verantwortlich ist. In der Leber ist die PDH in zwei Formen vorfindbar: in der aktiven Form (PDH-E) und in der inaktiven Form (PDH-I). Die Interkonversion zwischen diesen beiden Formen ist ein wichtiger Mechanismus, um die Aktivität der PDH an den Energiebedarf der Zelle anzupassen. In der Leber ist die PDH-I die vorherrschende Form, während in anderen Geweben wie Muskel und Herz die PDH-E vorherrscht. Die Umwandlung von PDH-I in PDH-E wird durch verschiedene Faktoren reguliert, darunter auch durch Hunger und Wiederfütterung sowie durch Insulinbehandlung. Diese Faktoren beeinflussen die Expression und die Aktivität der PDH in der Leber, was wiederum die Energieproduktion und den Stoffwechsel der Zelle beeinflusst.

Es wird gezeigt, dass die PDH in der Leber in zwei Formen vorfindbar ist: in der aktiven Form (PDH-E) und in der inaktiven Form (PDH-I). Die Umwandlung von PDH-I in PDH-E wird durch verschiedene Faktoren reguliert, darunter auch durch Hunger und Wiederfütterung sowie durch Insulinbehandlung. Diese Faktoren beeinflussen die Expression und die Aktivität der PDH in der Leber, was wiederum die Energieproduktion und den Stoffwechsel der Zelle beeinflusst.

ZUSAMMENFASSUNG

Aktiver Anteil und Gesamtaktivität der Pyruvatdehydrogenase wurden in Rattenleberhomogenaten bestimmt. Dabei wurde die sofort nach Homogenisation erfaßbare Aktivität als der in der intakten Leber ursprünglich vorhandene aktive Anteil, d.h. die Dephospho-Form der Pyruvatdehydrogenase, angesehen. Als Gesamtaktivität der Pyruvatdehydrogenase wurde dagegen die Aktivität betrachtet, die nach Inkubation des Homogenates mit Mg^{2+} und teilweise gereinigter Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase gefunden wurde, wobei die inaktive Form zur aktiven dephosphoryliert wurde. In Lebern normal gefütterter Ratten betrug der aktive Anteil nur etwa 1/6 der gesamten Pyruvatdehydrogenase-Aktivität, im Unterschied zu anderen Geweben wie Herzmuskel, Niere, Gehirn und Fettgewebe, wo etwa 2/3 der Gesamtaktivität in der aktiven Form vorliegen (Wieland et al., 1971; Siess et al., 1971).

Um die mögliche physiologische Rolle der Pyruvatdehydrogenase-Interkonvertierung für die Regulation des Pyruvatstoffwechsels in der Leber zu untersuchen, wurden aktive Form und Gesamtaktivität in Rattenlebern unter verschiedenen metabolischen Bedingungen gemessen. Nach Hunger und Wiederfütterung mit Glucose sowie nach Behandlung mit Nicotinsäure oder Insulin waren deutliche Veränderungen des aktiven Anteils ohne wesentliche Beeinflussung der Gesamtaktivität der PDH zu beobachten. Im allgemeinen gingen Stoffwechselsituationen mit erniedrigtem Spiegel an freien Fettsäuren in Serum mit einem Anstieg, eine Erhöhung der Fettsäurekonzentration dagegen mit einem Abfall der aktiven Form der PDH einher.

Es wird daraus geschlossen, daß in der Leber, ähnlich wie im Herzmuskel und der Niere (Wieland et al., 1971) Fettsäuren

eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle der Pyruvatdehydrogenase-Interkonvertierung spielen. Die Bedeutung dieses Mechanismus für die Regulation des Pyruvatstoffwechsels in der Leber wird, unter Berücksichtigung der Rückkoppelungskontrolle der PDH durch Acetyl-CoA, ausführlich diskutiert.

EINLEITUNG

Die Entdeckung, daß die Pyruvatdehydrogenase in Säugetierorganen zu den interkonvertierbaren Enzymen gehört (1-6) hat großes Interesse an der möglichen physiologischen Bedeutung dieses Phänomens für den Pyruvatstoffwechsel hervorgerufen. Es konnte bisher gezeigt werden, daß die Pyruvatdehydrogenase in verschiedenen Organen der Ratte in der aktiven und der inaktiven Form vorliegt, und daß das Verhältnis der beiden Formen durch verschiedene metabolische Einflüsse verändert wird. So wurden zum Beispiel 2/3 der Gesamtaktivität der PDH im Herzmuskel und in der Niere von normal gefütterten Ratten in der aktiven Form vorgefunden. Nach einer Hungerperiode von 24 Stunden fiel der aktive Anteil auf 1/6 der Gesamtaktivität ab und kehrte 2 Stunden nach Wiederfütterung mit Glucose zum Ausgangswert zurück (7-9). Aus diesen und weiteren Untersuchungen mit diabetischen Ratten wurde deutlich, daß ein erhöhtes Angebot an freien Fettsäuren durch verstärkte Lipolyse mit niedrigen Spiegel an aktiver Pyruvatdehydrogenase einhergeht und *v i c e v e r s a*. Außerdem bestärkten Perfusionsexperimente mit dem isolierten Rattenherzen (10) die Annahme, daß die Fettsäureoxydation durch einen noch unbekannten Mechanismus den Interkonvertierungs-Zyklus der PDH in Richtung auf eine Inaktivierung des Enzyms hin beeinflußt.

Untersuchungen am Rattenhirn (6) und Fettgewebe zeigten ebenfalls die Anwesenheit der beiden Formen der PDH. Insulin und andere Hormone haben einen deutlichen Einfluß auf die Relation der beiden Formen im Fettgewebe (11-13).

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, das Verhältnis zwischen aktiver und inaktiver Pyruvatdehydrogenase in der Leber zu bestimmen und Veränderungen unter verschiedenen metabolischen Bedingungen zu demonstrieren. Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden anderenorts bereits kurz vorgetragen (7,14).

MATERIALIEN UND METHODEN

Versuchstiere

Es wurden 120 - 200 Gramm schwere männliche Ratten (Sprague-Dawley, Fa. Wiga, München-Ottobrunn) verwendet, die, soweit nicht anderes vermerkt, ein Standardfutter (Labortierfutter 57Z, J. Zahn II, Hockenheim) und Wasser bekamen.

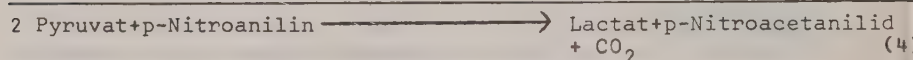
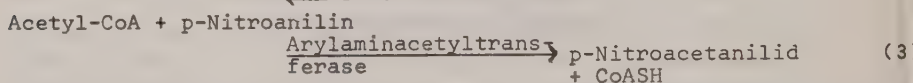
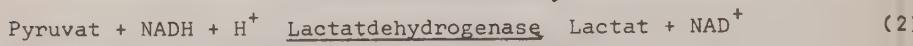
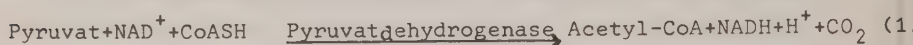
Anfertigung von Leberhomogenaten

Nach Abnahme einer Blutprobe aus der vena cava inf. unter leichter Äthernarkose wurde ein Stück aus der Leber herausgeschnitten und sofort mit einer in flüssigem N_2 vorgekühlten Wollenberger-Zange eingefroren. Die Leberprobe wurde dann in einem Mörser unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zerrieben, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und gewogen. Dann wurde das fünffache Volumen an gekühltem ($-20^{\circ}C$) 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, der 40 % (v/v) Glycerin enthielt, zugegeben.

Die Homogenisation wurde bei -10°C mit einem hochtourigen Homogenisator für kleine Gewebeproben (Ultra-Turrax 10 N Jahnke & Kunkel, Staufen). durchgeführt.

Bestimmung der Pyruvatdehydrogenase

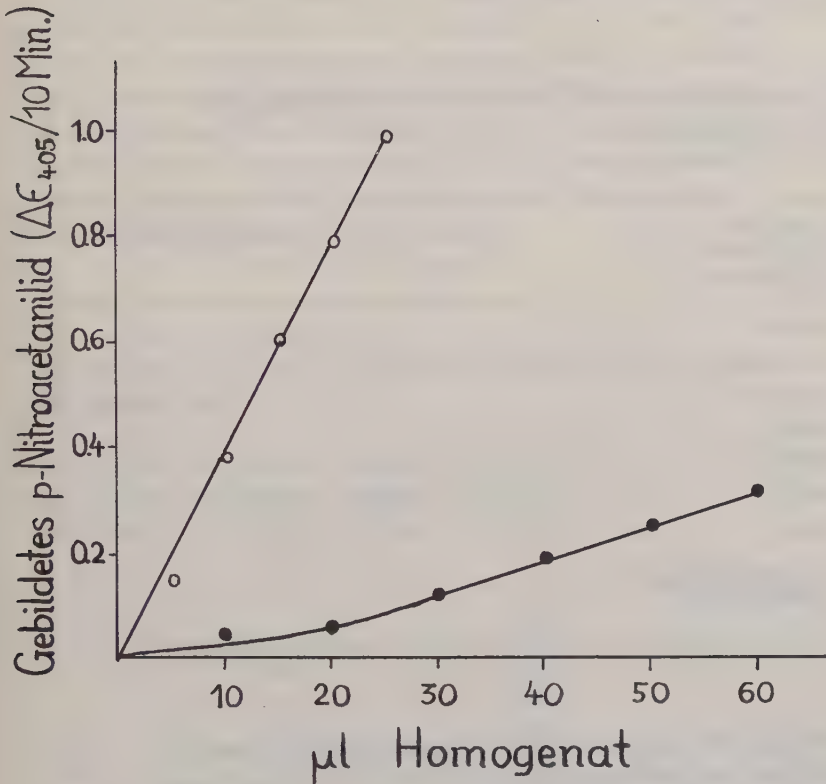
Mit dem folgenden Reaktionssystem wurde die Pyruvatdehydrogenase-Aktivität im rohen Leberhomogenat gemessen:



Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml: Kaliumphosphatpuffer, pH 8.0, 25 mM, p-Nitroanilin, 0,16 mM, MgCl_2 , 1 mM, Mercaptoäthanol, 20 mM, NAD^+ , 1 mM, CoASH, 0.1 mM, $20 \mu\text{g}$ Lactatdehydrogenase, 50 - 100 mE Arylaminacetyltransferase (EC 2.3.1.5.) und $30 \mu\text{l}$ Leberhomogenat. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 ml einer 200 mM Na-Pyruvatlösung gestartet. Zum Leerwert wurde stattdessen H_2O gegeben.

Die Extinktionsabnahme wurde im Eppendorff-Photometer bei 405 nm und 25°C verfolgt. Die Reaktion verläuft über 20 min linear und ist über einen weiten Bereich der eingesetzten Menge Homogenat proportional (Abb.1). Auch ohne Zugabe von Pyruvat nimmt die Extinktion etwas ab, was bei der Berechnung berücksichtigt wurde. Eine Komponentenabhängigkeit des Testsystems zeigt Tabelle 1.

Abb. 1 ABHÄNGIGKEIT DER BILDUNG VON p-NITROACETANILID VON
DER EINGESETZTEN MENGE HOMOGENAT



Leberhomogenat einer normal gefütterten Ratte vor (●) und nach (o) Aktivierung mit Mg^{2+} und exogener PDH-Phosphatase.

Weitere Einzelheiten s. Legende zu Abb. 2

Tabelle 1

KOMPONENTENABHÄNGIGKEIT DER BESTIMMUNGSMETHODE FÜR
PYRUVATDEHYDROGENASE

Aus dem Testgemisch weggelassene Komponente	Gebildetes p-Nitroacetanilid ($\Delta \epsilon_{405} / 10 \text{ min bei } 25^\circ \text{ C}$)
keine	0.365
Pyruvat	0
CoA-SH	0
NAD ⁺	0
TPP ^{x)}	0.380
Mg ²⁺	0.275
LDH	0.135
Arylaminacetyl- transferase	0

x) Offensichtlich reicht das PDH-gebundene TPP für die Messung der maximalen Aktivität aus. Es wurde deshalb aus dem Testgemisch weggelassen.

Die Pyruvatdehydrogenase-Aktivität ist in Millieinheiten (mE) angegeben. 1 mE entspricht der Bildung von 1 nMol p-Nitroacetanilid pro Minute bei 25°C unter Standardbedingungen. In Übereinstimmung mit (16,17) wurde für p-Nitroanilin ein molarer Extinktionskoeffizient (ϵ_{405}) von 12000 $\text{cm}^2 \text{mMol}^{-1}$ gefunden.

Wie Tabelle 2 zeigt, wurde eine gereinigte Pyruvatdehydrogenase aus Schweineherz, die zusammen mit Leberhomogenat dem beschriebenen Testsystem zugesetzt wurde, zu nahezu 100 % wiedergefunden. Der Test mit p-Nitroanilin und die auf der Messung des gebildeten NADH bei 334 nm basierende direkte optische Bestimmungsmethode (18) wurden unter Verwendung von gereinigter PDH miteinander verglichen und zeigten gute Übereinstimmung.

Tabelle 2

WIEDERFINDUNG VON ZUM ROHEN LEBERHOMOGENAT ZUGESETZTER
GEREINIGTER PDH

Zum Testgemisch zugesetzte PDH		Gebildetes p-Nitroacetanilid ($\Delta \epsilon_{405}/10 \text{ min}$)	Wiederfindung (%)
Leberhomogenat (μl)	Gereinigte PDH aus Schweineherz (μl)		
20	-	0.078	-
-	10	0.170	-
-	20	0.350	-
-	30	0.520	-
20	10	0.275	116
20	20	0.413	96
20	30	0.598	100
20	-	0.230	-
-	20	0.220	-
20	20	0.430	91

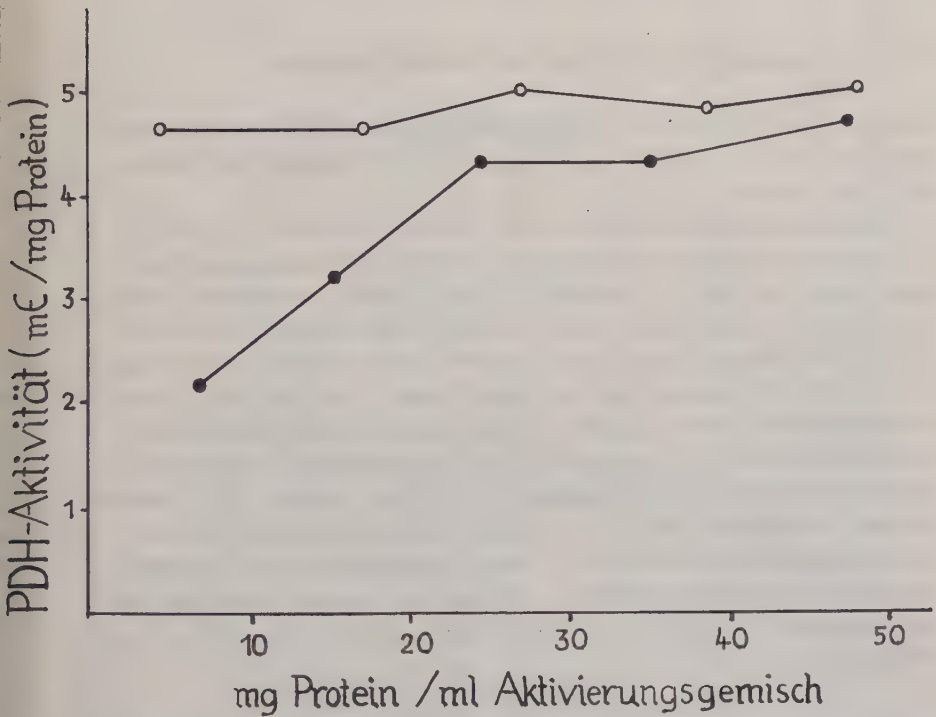
Andere Bestimmungsmethoden

Glucose im Serum wurde enzymatisch im Autoanalyzer (Technicon) (19), freie Fettsäuren wurden im Serum mit einer modifizierten Methode nach Duncombe (20, 21) und Protein wurde mit einer modifizierten Biuret-Methode (22) bestimmt.

Reagentien

Alle Reagentien waren von analytischer Reinheit und stammten von der Firma Merck (Darmstadt). Die verwendeten Enzyme und Coenzyme waren Erzeugnisse der Firma Boehringer (Mannheim). Die Arylaminacetyltransferase wurde aus Taubenleber nach der Methode von Tabor et al. (17) mit folgenden leichten Abänderungen gewonnen: die Anfertigung von Acetonpulver am Beginn der Präparation wurde weggelassen. Stattdessen wurden die bei -20°C gelagerten Taubenlebern in eine Star-Mix-Gerät 3×1 min mit dem zweifachen Volumen an 1 mM EDTA-Lösung homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde das Sediment noch 2 mal mit dem einfachen Volumen 1 mM EDTA-Lösung in der gleichen Weise extrahiert. Die vereinigten Überstände wurden dann entsprechend der Originalvorschrift mit Aceton und Aluminiumhydroxyd behandelt. Bei der Gelelution wurde statt 10 mM nur 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.8, verwendet. Die vereinigten Eluate wurden dann durch Zugabe von Ammoniumsulfat (Endkonzentration: 80 % Sättigung) eingeengt, das Präzipitat nach Zentrifugation in einem kleinen Volumen 5 mM Kaliumphosphatpuffer wieder aufgenommen und vor der Verwendung gegen den gleichen Puffer über Nacht dialysiert.

Abb.2 ABHÄNGIGKEIT DER AKTIVIERUNG DER LEBERPYRUVATDEHYDROGENASE
VON DER KONZENTRATION DES HOMOGENATES IM AKTIVIERUNGSANSATZ



Die Leber einer normal gefütterten Ratte wurde wie unter "Methoden" beschrieben homogenisiert, mit dem Unterschied, daß 1 g Leber in 2 ml eines Glycerin-freien Puffers aufbereitet wurden. Da Glycerin in höheren Konzentrationen die Aktivierung der PDH hemmt, wurde es in diesem Experiment weggelassen. Der Inkubationsansatz (o) enthielt 200 μ l Leberhomogenat mit der angegebenen Menge Protein, 20 mM $MgCl_2$, ungefähr 360 μ g einer 150fach angereicherten PDH-Phosphatase aus Schweineherz (5) und Wasser in einem Gesamtvolumen von 600 μ l. (●) Ansatz ohne zusätzliche Phosphatase. Inkubation 60 Min. bei 25°C.

ERGEBNISSE

Aktive und inaktive Form der Pyruvatdehydrogenase

Die im frischen Leberhomogenat gemessene Pyruvatdehydrogenase-Aktivität wurde als der *in vivo* vorliegende aktive Anteil definiert.

Inkubation des Homogenates mit 20 mM Mg^{2+} bewirkt eine Aktivierung der im Gewebe vorhandenen Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase. Wie in Abb. 2 dargestellt ist in stark verdünnten Homogenaten die Aktivierung unvollständig, möglicherweise reicht hier die endogene Phosphatase zur völligen Dephosphorylierung und damit Aktivierung der inaktiven Form nicht aus. Dem Inkubationsansatz wurde deshalb eine gereinigte PDH-Phosphatase aus Schweineherz (5) zugesetzt, die bekanntermaßen auch mit der Phospho-Pyruvatdehydrogenase der Leber reagiert (3). Unter diesen Bedingungen war die Aktivierung der inaktiven PDH im Leberhomogenat bereits nach 10 min abgelaufen und blieb über mindestens 70 min unverändert. Im Kontrollansatz, der ohne Mg^{2+} und exogene Phosphatase inkubiert wurde, zeigte sich keine Veränderung.

Pyruvatdehydrogenase in Lebern normal gefütterter, gehungerter und gehungert-wiedergefütterter Ratten

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, liegen in Lebern normal gefütterter Ratten 16.2% der gesamten Pyruvatdehydrogenase-Aktivität in der aktiven Form vor. Nach 24 Stunden Hunger war ein leichter aber signifikanter Abfall dieses aktiven Anteils auf 10.4 % zu beobachten. Ähnliche Veränderungen wurden in Lebern von streptozotocin-diabetischen Ratten gefunden (C. Patzelt unveröff.).

PDH-AKTIVITÄTEN IN LEBERN VON GEFÜTTERTEN, GEHUNGERTEN, GEHUNGERT-WIEDERGEFÜTTERTEN UND MIT NICOTINSÄURE BEHANDELTEN RATTEN ^x

	N	Vor Aktivierung (PDH _a)	Nach Aktivierung (PDH _a gesamt)	PDH _a in % von PDH _a gesamt	Freie Fettsäuren im Serum ($\mu\text{Äq/l}$)
Gefüttert	12	123 $\pm$ 6.7 (p < 0.001)	748 $\pm$ 23.3 (n.s.)	16.2 $\pm$ 0.9 (p < 0.001)	340 $\pm$ 63 (p < 0.02)
24 Stunden gehungert	12	80 $\pm$ 6.7	780 $\pm$ 36.7	10.4 $\pm$ 0.6	657 $\pm$ 38
Mit Nicotinsäure behandelt xx	6	197 $\pm$ 20 (p < 0.005)	750 $\pm$ 30 (n.s.)	26.2 $\pm$ 3.4 (p < 0.02)	168 $\pm$ 16 (p < 0.01)
Kontrollen	6	113 $\pm$ 3.3	738 $\pm$ 36.7	15.5 $\pm$ 0.9	365 $\pm$ 53
24 Stunden gehungert (Kontrollen)	16	60 $\pm$ 7.2. (p < 0.02)	717 $\pm$ 45 (n.s.)	9.5 $\pm$ 1.0 (p < 0.005)	1266 $\pm$ 149 (p < 0.005)
90 min nach Wiederfütterung mit Glucose xxx	9	149 $\pm$ 35 (n.s.)	726 $\pm$ 68 (n.s.)	20.8 $\pm$ 4.1 (n.s.)	465 $\pm$ 74 (n.s.)
360 min nach Wiederfütterung mit Glucose	9	162 $\pm$ 20	705 $\pm$ 29	23.0 $\pm$ 3.9	226 $\pm$ 49

^x Es sind Mittelwerte [†] Standardabweichungen des Mittelwertes in mE/g Feuchtgewicht angegeben
N = Anzahl der Experimente

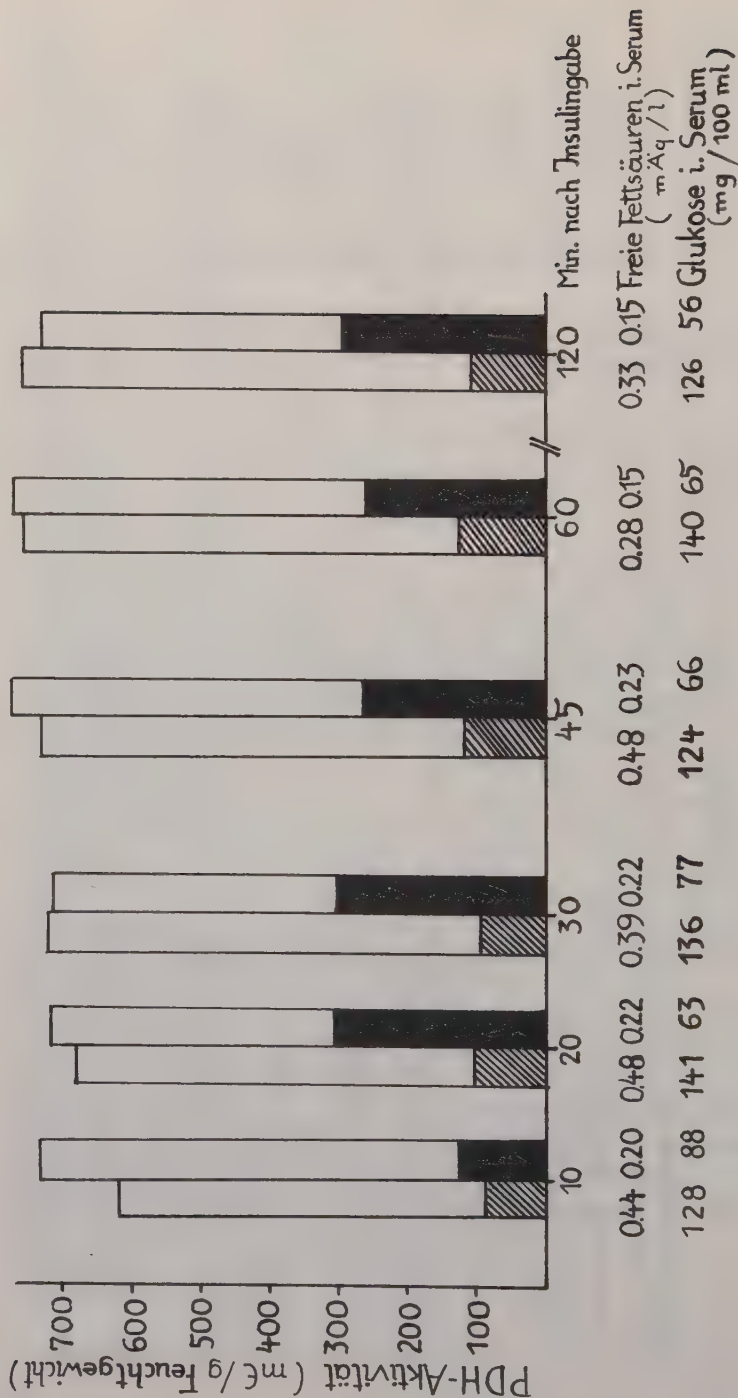
p = statistische Signifikanz nach dem t-Test von Student

xx Die Tiere erhielten subkutan 250 mg/kg neutralisierte Nicotinsäure 2 Stunden vor der Tötung.

Die Kontrollen erhielten stattdessen physiologische NaCl-Lösung.

xxx Den 24 Stunden gehungerten Ratten wurden per Schlundsonde 3 g Glucose zum Zeitpunkt Null gegeben.
Die Tötung erfolgte zu den angegebenen Zeiten. Die Kontrolltiere erhielten anstelle von Glucose physiologische NaCl-Lösung.

Abb. 3 EINFLUSS VON INSULIN AUF DIE AKTIVITÄT DER PYRUVATDEHYDROGENASE IN DER LEBER



Normal gefütterten Ratten wurden 10 E Alt-Insulin intraperitoneal injiziert. Die Kontrolltiere bekamen stattdessen 0.9 %ige NaCl-Lösung. Die Gesamthöhe der Säulen stellt die Gesamtaktivität der PDH dar, die schattierten Teile den aktiven Anteil:  Kontrollen,  Insulin-behandelt

Wenn gehungerte Ratten per Schlundsonde wieder gefüttert wurden, kehrte der aktive Anteil innerhalb von 90 min auf die ursprünglichen und sogar etwas höhere Werte zurück (Tab. 3). Schlundsondenfütterung mit Olivenöl oder physiologischer Na Cl-Lösung blieb ohne Einfluß auf die Konzentration der aktiven PDH. Damit reagiert das Pyruvatdehydrogenasesystem in der Leber in ähnlicher Weise, wenn auch weniger deutlich, wie im Herzmuskel und in der Niere auf Nahrungsentzug und Wiederfütterung mit Glucose.

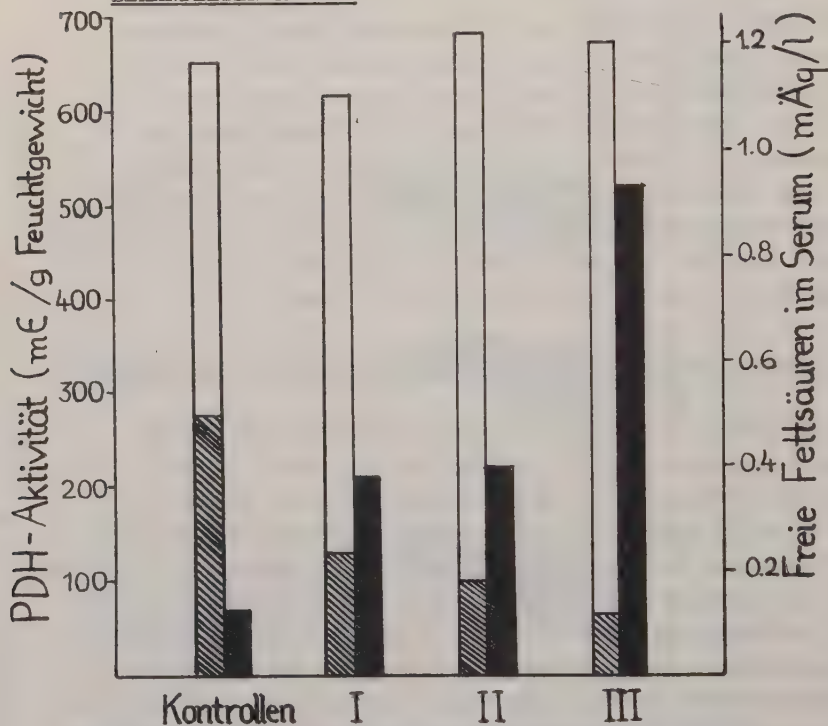
Einfluß von Nicotinsäure auf die Leber-Pyruvatdehydrogenase

Die erniedrigten Konzentrationen an aktiver PDH in Herzmuskel und Niere nach 24 Stunden Hunger können durch Behandlung der Ratten mit Nicotinsäure normalisiert worden (9). Die Daten in Tabelle 3 zeigen einen deutlichen Anstieg der aktiven Form der Leber-PDH 2 Stunden nach subkutaner Injektion von Nicotinsäure gegenüber den mit physiologischer NaCl-Lösung behandelten Kontrolltieren. Diese Veränderung der Pyruvatdehydrogenase-Aktivität geht mit einem deutlichen Abfall der Konzentration der freien Fettsäuren im Serum einher, entsprechend früheren Beobachtungen (9), nach denen der Einfluß der Nicotinsäure auf das Pyruvatdehydrogenase-System eine Folge ihrer antilipolytischen Wirkung ist.

Einfluß von Insulin auf die Leber-Pyruvatdehydrogenase

Hohe Dosen von Insulin verursachen deutlich stärkere Veränderungen des Pyruvatdehydrogenase-Systems in der Leber. In diesen Experimenten bekamen Ratten 10 E Alt-Insulin und wurden nach den angegebenen Zeitintervallen getötet. Die Abbildung 3 zeigt, daß hier der aktive Anteil der PDH 20 min nach Insulin-

Abb.4 EINFLUSS VON OLEAT AUF DIE PYRUVATDEHYDROGENASE
DER LEBER IN NORMAL GEFÜTTERTEN, MIT INSULIN
BEHANDELTEN RATTEN



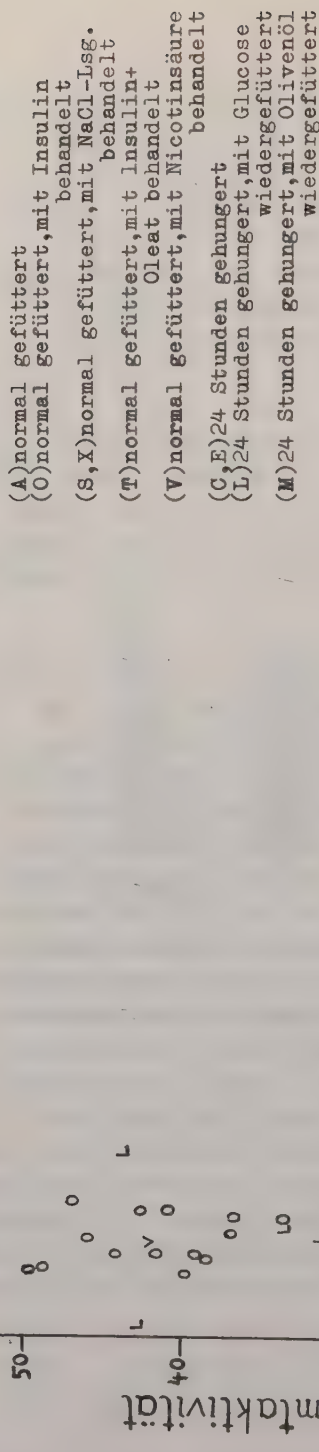
Die Tiere wurden wie in der Legende zu Abb.3 angegeben mit Insulin behandelt. 20 Min. später wurden sie mit Äther narkotisiert und bekamen die folgenden Lösungen in eine Schwanzvene infundiert: Kontrollen: 3 ml einer 11.5 %igen Lösung von Rinderserum-Albumin; (I) 3ml einer 6.5 %igen Albumin-Lösung mit 20 μ Mol Oleat; (II) 3 ml einer 10.1 %igen Albumin-Lösung mit 34.2 μ Mol Oleat; (III) 3 ml einer 19.3 %igen Albumin-Lösung mit 60.9 μ Mol Oleat. Dauer der Infusion 20 Min. Die schwarzen Säulen geben die Konzentration freier Fettsäuren im Serum, die halbschattierten Säulen die Pyruvatdehydrogenase-Aktivität wie in Abb. 3 wieder. Es sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten angegeben.

gabe auf nahezu 50 % der Gesamtaktivität anstieg, d.h. auf das Dreifache des Normalwertes, und über 2 Stunden unverändert blieb. Erwartungsgemäß verursachte die hohe Insulindosis über den Beobachtungszeitraum einen starken Abfall der Konzentrationen von freien Fettsäuren und Glucose im Serum (Abb. 3).

In weiteren Experimenten wurde Insulin-behandelten Ratten 20 min nach Zufuhr des Hormons Albumin-gebundenes Oleat (23) in die Schwanzvene infundiert. Wie Abbildung 4 zeigt fielen die nach Insulin erhöhten Werte an aktiver PDH in der Leber um so stärker ab, je mehr die Fettsäurekonzentration im Serum durch Oleatzufuhr erhöht wurde.

Diese Befunde sowie weitere von Studien an der isoliert perfundierten Leber (24) stützen die Annahme, daß ähnlich wie im Herzmuskel und in der Niere die freien Fettsäuren einen wichtigen Faktor für die Kontrolle des Pyruvatdehydrogenase-Systems darstellen. Die Abhängigkeit zwischen der Konzentration freier Fettsäuren im Serum und aktiver PDH in der Leber ist in Abbildung 5 widergegeben. Aus dieser Zusammenstellung aller beschriebener Experimente ist ersichtlich, daß der aktive Anteil der PDH in der Leber mit steigenden Fettsäurekonzentrationen abnimmt und *v i c e v e r s a*. Eine ähnliche Abhängigkeit wurde schon früher für die aktive Pyruvatdehydrogenase in Herzmuskel und Niere gezeigt (9).

UNTER VERSCHIEDENEN METABOLISCHEN BEDINGUNGEN



DISKUSSION

Die beschriebenen Experimente erlauben den Schluß, daß in der Rattenleber, ähnlich wie in anderen Organen, die Pyruvatdehydrogenase zum Teil in einer aktiven (Dephospho-) Form und zum Teil in einer inaktiven (Phospho-) Form vorliegt. Im Gegensatz zu Herzmuskel, Niere, Gehirn und Fettgewebe, wo normalerweise 2/3 der gesamten PDH aktiv sind (9, 6, 12), ist der aktive Anteil in der Leber beträchtlich geringer und beträgt nur 1/6 der Gesamtaktivität. Ein Vergleich der Konzentrationen an aktiver PDH bezogen auf das Feuchtgewicht in verschiedenen Geweben ergibt eine angenäherte Relation von 1:5:6:20 für Leber, Gehirn, Niere und Herzmuskel. Das bedeutet, daß unter normalen Ernährungsbedingungen die oxydative Decarboxylierung von Pyruvat *in vivo* in der Leber in viel geringerem Maße stattfindet als in anderen Organen. Die Pyruvatcarboxylase ist als erster Schritt der Gluconeogenese aus Pyruvat in der Leber 10-20 mal aktiver als die Pyruvatdehydrogenase (25). Schon aus dem Vergleich der Aktivitäten dieser beiden Enzyme ergibt sich, daß Pyruvat in der Leber in viel stärkerem Maße zu Glucose synthetisiert als zu Acetyl-CoA decarboxyliert wird.

Glogner und Schurek fanden bei ihren Messungen der Oxydationsrate von (6-³H)-Glucose in der isoliert perfundierten Rattenleber, daß über einen Zeitraum von 90 min nur 8 % des gesamten Sauerstoffverbrauchs für die Oxydation von Glucose herangezogen wurden (26). Aus diesen Daten läßt sich errechnen, daß 0.03 μ Mol Glucose, entsprechend 0.06 μ Mol Pyruvat, pro Gramm Leber und Minute zu CO₂ und Wasser oxydiert wurden.

In unseren Untersuchungen betrug die Pyruvatdehydrogenase-Aktivität, d.h. der aktive Teil, ungefähr $0.25 \mu\text{Mol/g Leber/min}$, wobei für die Umrechnung von 25° auf 37°C der Wert mit 2 multipliziert wurde. Berechnungen der Oxydationsrate für Pyruvat aus Leberperfusionsexperimenten (27) lagen mit $0.43 \mu\text{Mol/g Leber/min}$ in einer ähnlichen Größenordnung. Wenn die $0.06 \mu\text{Mol Pyruvat}$, die *via* PDH der Endoxydation zugeführt werden, von unserem Wert für die Pyruvatdehydrogenase-Aktivität abgezogen werden, so verbleiben von dem Pyruvat, das den Acetyl-CoA-"pool" erreicht ungefähr $0.2 \mu\text{Mol/g/min}$, die der Leber für andere Reaktionen, vornehmlich für die Fettsäuresynthese, zur Verfügung stehen. Unter Verwendung von $^3\text{H}_2\text{O}$ erhielt Lowenstein (28) eine durchschnittliche Inkorporationsrate von $1 \mu\text{Mol Acetyl-Gruppen/g Leber/min}$ in Fettsäuren *in vivo*. Aus diesen Daten und unseren Messungen *in vitro* scheint nur ein verhältnismäßiger geringer Anteil an C_2 -Einheiten aus dem C_3 -"pool" zur Fettsäuresynthese herangezogen zu werden. Basierend auf Messungen der Enzymaktivitäten der Glycolyseketten in der Leber (29) kann die Pyruvatdehydrogenase als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Synthese von Fettsäuren aus Glucose betrachtet werden. Dabei ist bemerkenswert, daß in der Leber der aktive Anteil der PDH *in vivo* (30) und in Leberperfusionsexperimenten (24) durch Fructose erhöht werden kann, die bekanntermaßen ein besseres Substrat für die Fettsäuresynthese darstellt als Glucose (31).

Das Ansprechen der Pyruvatdehydrogenase in der Leber auf Hunger und auf Wiederfütterung mit Glucose sowie auf Behandlung der Versuchstiere mit Nicotinsäure ist ähnlich wie in Herzmuskel und Niere (8). Behandlung von normal gefütterten Ratten mit einem Überschuß an Insulin führt zu den stärksten

Erhöhungen der aktiven PDH in der Leber. Durch einen Anstieg der Fettsäurekonzentration im Serum durch Infusion von Oleat ließ sich die Insulin-bedingte Erhöhung des aktiven Teils der PDH vollständig rückgängig machen. Das scheint darauf hinzudeuten, daß Insulin durch eine Erniedrigung des Spiegels freier Fettsäuren auf das Pyruvatdehydrogenase-System wirkt. Inwieweit Insulin einen direkten Einfluß auf die Interkonvertierung hat, bleibt noch zu untersuchen.

Es ist bisher unbekannt, durch welche Mechanismen das Pyruvatdehydrogenase-System *in vivo* reguliert wird. Auf Grund unserer Studien an intakten Ratten und Perfusions-experimenten mit Rattenherzen und -lebern nehmen wir an, daß die Fettsäureoxydation irgendwie die Konversion des Enzyms von der aktiven zur inaktiven Form bewirkt. So ist in Geweben, die sowohl Kohlenhydrate als auch Fettsäuren utilisieren können, das Verhältnis zwischen aktiver und inaktiver PDH von dem jeweiligen Angebot an Fettsäuren bzw. Glucose abhängig. Der auch im gefütterten Tier niedrige Anteil an aktiver PDH in der Leber entspricht der Tatsache, daß in diesem Organ bevorzugt Fettsäuren verbrannt werden, auch wenn genügend Kohlenhydrate verfügbar sind. In diesem Zusammenhang erscheint auch interessant, daß im Gehirn, wo Kohlenhydrate die hauptsächlichste Energiequelle darstellen, die Enzymaktivität nach Hunger unbeeinflußt bleibt (6).

Es ist bekannt, daß die Decarboxylierung von Pyruvat und die Lipogenese in der Leber im Hunger und im akuten Diabetes stark gehemmt sind, d.h. in Situationen eines erhöhten Fettsäureangebotes. Umgekehrt wird unter den Bedingungen einer gesteigerten Lipidsynthese, wie Wiederfütterung mit Kohlenhydraten oder Behandlung mit Insulin die Oxydation von Pyruvat normalisiert

oder sogar gesteigert. (Einen Überblick über die umfangreiche Literatur gibt Nikkilä (33)). Die Hemmung der Decarboxylierung von Pyruvat durch die Oxydation von Fettsäuren wurde noch direkter an Lebermitochondrien (34-37) und in der perfundierten Rattenleber (38, 39) demonstriert. In seinen Perfusionsexperimenten konnte Haft zeigen, daß im Diabetes die Oxydation von Pyruvat in etwa dem gleichen Ausmaß gehemmt ist wie die Synthese von Fettsäuren aus Acetyl-CoA (39). Dies deutet wiederum darauf hin, daß die Pyruvatdehydrogenase der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Umwandlung von Kohlenhydraten in Fettsäuren ist.

Hinsichtlich der Regulation des Stoffwechsels erhebt sich nun die Frage, inwieweit die hier beschriebenen Veränderungen im Interkonvertierungs-System der PDH für Veränderungen der Verstoffwechselungsrate des Pyruvats unter den verschiedenen Fütterungs- und hormellen Bedingungen verantwortlich sind. Am isoliert perfundierten Rattenherzen erhielten wir durch gleichzeitige Messung der aktiven Form der PDH und der Decarboxylierung von (1-¹⁴C)-Pyruvat dazu weitere Hinweise (39, 40). Dabei war in Perfusionsexperimenten mit Palmitat die Erniedrigung des aktiven Anteils der PDH deutlich geringer als die der Oxydation des markierten Pyruvats. Dies deutet darauf hin, daß *in vivo* möglicherweise ein weiterer, zusätzlicher Mechanismus an der Kontrolle des Pyruvatdehydrogenase-Schrittes beteiligt ist. Acetyl-CoA, das ein starker Hemmer der PDH im Herzmuskel (18,41) und in der Leber (7) *in vitro* ist, und das während der Fettsäureoxydation in diesen Geweben akkumuliert, ist hier wahrscheinlich der verantwortliche Metabolit.

Solch eine Hemmung durch Acetyl-CoA mag auch in der Leber vorliegen und müßte durch Perfusionsexperimente mit markiertem Pyruvat bewiesen werden.

Eine solche Anordnung würde auch den direkten Vergleich der Aktivität der Pyruvatdehydrogenase und der Syntheserate von Fettsäuren unter den Bedingungen einer gesteigerten Lipidsynthese in der Leber ermöglichen.

TEIL II

INTERKONVERSION DER PYRUVATDEHYDROGENASE IN DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENLEBER

ZUSAMMENFASSUNG

Aktive Form und Gesamtaktivität der Pyruvatdehydrogenase wurden in Proben aus der isoliert perfundierten Leber gemessen.

Ohne Zugabe eines Substrates zum Perfusionsmedium betrug der aktive Anteil 20 % der gesamten PDH-Aktivität in Lebern gefütterter Ratten, in denen von gehungerten Ratten dagegen nur etwa 10 %. Diese Aktivitäten blieben über eine Perfusionszeit von 120 min konstant. Die Zugabe von 10 mM Pyruvat zum Perfusionsmedium verursachte einen sofortigen, etwa dreifachen Anstieg der aktiven Form der PDH. Einen ähnlichen Effekt hatte die Zugabe von 20 mM Fructose, die in der Leber teilweise zu Pyruvat metabolisiert wird. 10 mM Lactat führte zu einem wesentlich geringeren Anstieg der Pyruvatdehydrogenase-Aktivität, verglichen mit dem Effekt von Pyruvat und Fructose. Bei allen diesen Experimenten zeigte die Gesamtaktivität keine deutlichen Veränderungen.

Zwischen den Konzentrationen an Pyruvat im Perfusionsmedium und der aktiven Pyruvatdehydrogenase in den mit und ohne Substrat perfundierten Lebern fand sich eine exponentielle Abhängigkeit.

Die Zugabe von 2mM Oleat zum Medium machte den durch Pyruvat oder Fructose verursachten Anstieg der aktiven Form der PDH wieder rückgängig. Wenn aber gleichzeitig d-(+)-Decanoylcarnitin zugesetzt wurde, blieb die Wirkung von Oleat auf die PDH_a aus. Dies deutet darauf hin, daß die Verstoffwechselung von Fettsäuren für die Interkonvertierung von PDH_a in PDH_b notwendig ist.

Die mögliche Bedeutung von Pyruvat und Fettsäuren für die Regulation der Pyruvatdehydrogenase-Interkonvertierung wird abschließend diskutiert.

EINLEITUNG

In Homogenaten aus gefriergestoppten Leberproben normal gefütterter Ratten wurden weniger als 20 % der Pyruvatdehydrogenase-Aktivität in der aktiven Form (PDH_a) vorgefunden (s. Teil I und 42). Dieser Anteil veränderte sich in Abhängigkeit vom Ernährungszustand und unter hormoneller Einwirkung.

Im allgemeinen führten Situationen mit erhöhten freien Fettsäuren im Serum zu einem Abfall der PDH_a in der Leber, während umgekehrt eine Erniedrigung der Fettsäurekonzentration mit einem Anstieg der PDH_a einherging. Diese und andere Untersuchungen (9) führten zu der Vorstellung, daß das jeweilige Angebot an Fettsäuren als Substrat für den Energiestoffwechsel einen entscheidenden Faktor für die Interkonvertierung der PDH darstellt. Um diese Zusammenhänge eingehender zu untersuchen, wählten wir als Modell die isoliert perfundierte Rattenleber. Damit waren Untersuchungen an der isolierten Leber unter genau definierten Bedingungen und die wiederholte Abnahme von Proben aus einer einzigen Leber zur Bestimmung der PDH möglich. Die hier wiedergegebenen Befunde zeigen, daß der Zustand des interkonvertierbaren Pyruvatdehydrogenase-Systems in der perfundierten Leber von der Art des angebotenen Substrates abhängt. Freie Fettsäuren können

dem Einfluß von Substraten, die einen Anstieg der aktiven PDH verursachen, entgegenwirken. Ein vorläufiger Bericht über diese Experimente wurde bereits an anderer Stelle gegeben (24).

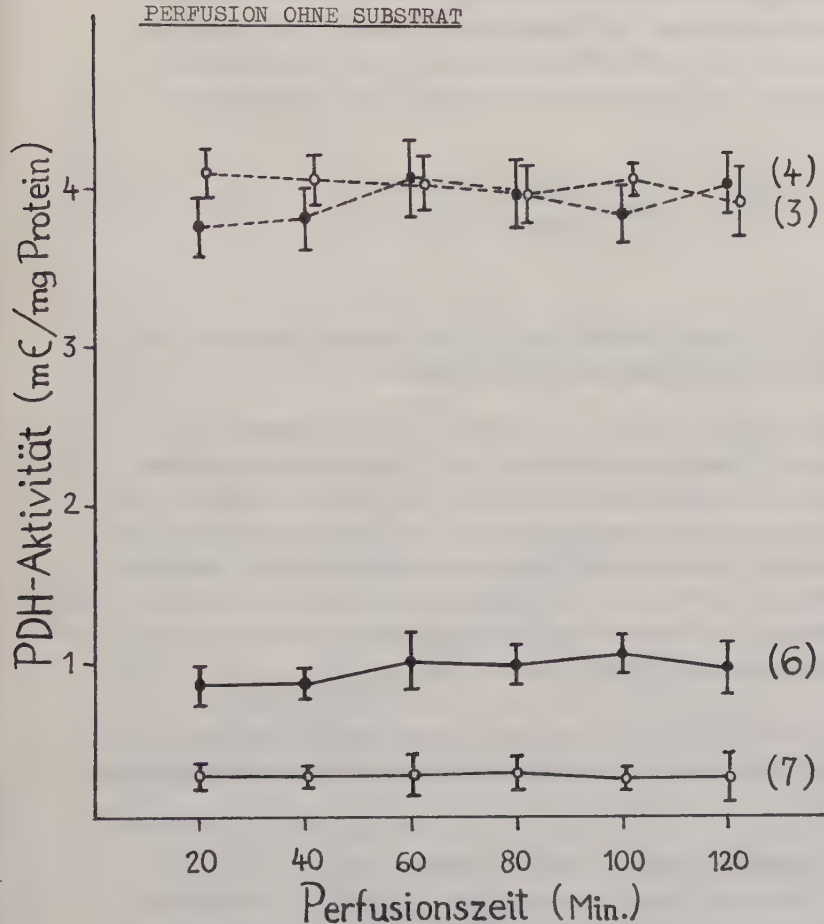
MATERIALIEN UND METHODEN

Die Perfusionstechnik und die Methoden zur Analyse des Perfusionsmediums wurden bereits früher im Detail beschrieben (38).

Während der Perfusion wurden 300 - 400 mg schwere Proben aus den verschiedenen Leberlappen in Abständen von 20 Minuten herausgeschnitten und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Um Unterschiede zwischen den einzelnen Leberlappen auszuschließen, wurde die Reihenfolge der Entnahme jedesmal geändert. Die gefrorenen Leberproben wurden dann in einem Mörser zerrieben und mit dem dreifachen Volumen eines 20 mM Kalium-Phosphatpuffers, pH 7.0, bei 0°C homogenisiert. Die Proteinkonzentrationen in den Homogenaten betrugen etwa 40 mg/ml. Die Pyruvatdehydrogenase wurde mit der in Teil I beschriebenen Methode bestimmt.

Für die Bestimmung der aktiven Form der PDH wurde das Leberhomogenat ohne weitere Vorbehandlung verwendet. Um ein Maß für die Gesamtaktivität zu erhalten, mußte die im Homogenat vorhandene inaktive Form der PDH in die aktive übergeführt werden. Wie in Teil I beschrieben, reicht in den hier verwendeten konzentrierten Homogenaten die endogene PDH-Phosphatase zur vollständigen Aktivierung aus, wenn das Homogenat mit 20 mM Mg^{2+} bei 25°C für 60 min inkubiert wird.

Abb.6 AKTIVE PYRUVATDEHYDROGENASE UND GESAMTAKTIVITÄT IN
LEBERN VON GEFÜTTERTEN UND GEHUNGERTEN RATTEN WÄHREND
PERFUSION OHNE SUBSTRAT



Es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen der Mittelwerte und in Klammern die Anzahl der Experimente angegeben. (●) gefüttert, (○) gehungert, — PDH_a, --- PDH_{gesamt}

D-(+)-Carnitin war ein Produkt von Otsuka Pharmaceutical Factory, Naruto, Tokushima, Japan. D-(+)-Decanoylcarnitin wurde nach der Vorschrift von Bremer (43) präpariert.

ERGEBNISSE

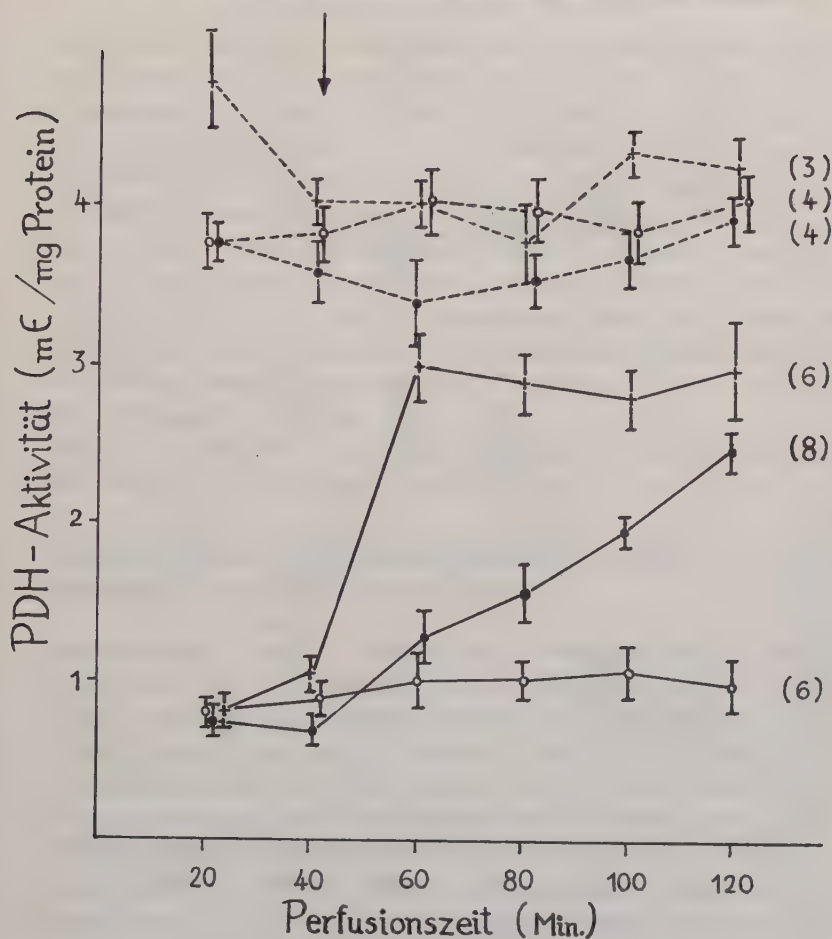
Aktive Form und Gesamtaktivität der Pyruvatdehydrogenase in der ohne Substrat perfundierten Leber

Die Abbildung 6 zeigt den Zustand des Pyruvatdehydrogenase-Systems in Lebern gefütterter und 24 Stunden gehungerter Ratten. Der aktive Anteil betrug etwa 20 %, in Lebern gehungerter Ratten dagegen nur 10 % der Gesamtaktivität, die ihrerseits keinen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen aufwies. In Abwesenheit von Substrat im Perfusionsmedium blieben die PDH-Aktivitäten über eine Dauer von 120 min nahezu unverändert.

Einfluß von Glucose, Fructose, Pyruvat und Lactat auf die Pyruvatdehydrogenase in perfundierten Lebern von gefütterten Ratten

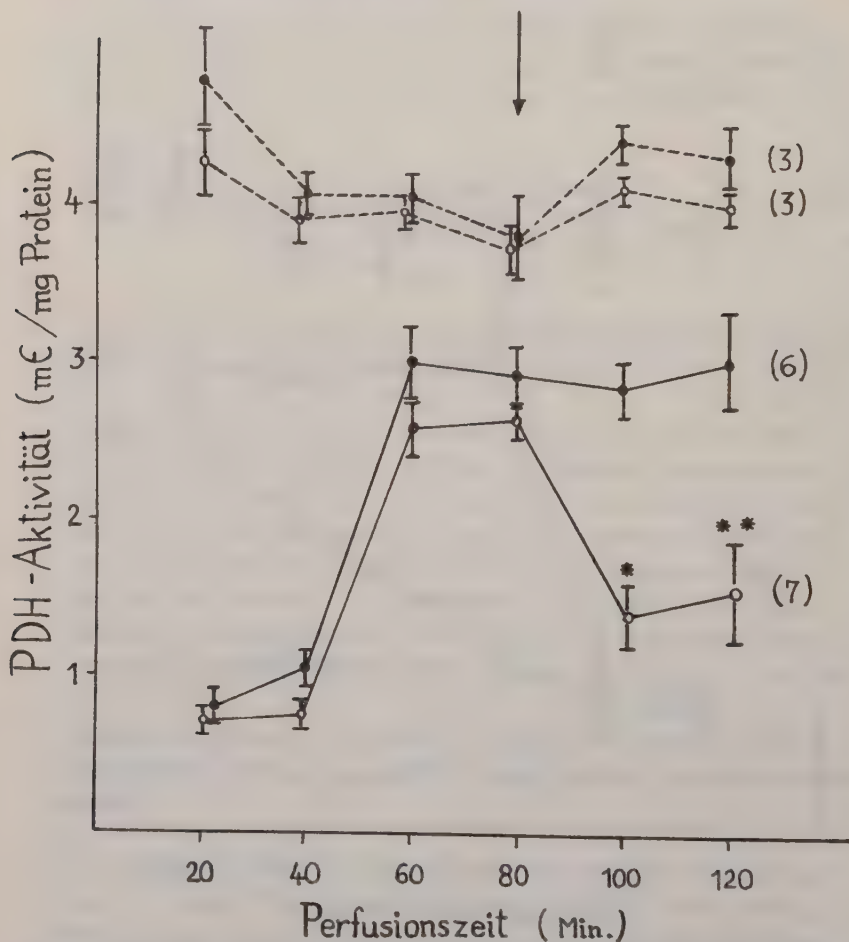
Die Zugabe von Glucose zum Medium bis zu einer Konzentration von 40 mM führte nur zu einem geringen, statistisch nicht signifikanten Anstieg der PDH_a in perfundierten Lebern von gefütterten Ratten. Wenn dagegen Fructose in einer Konzentration von 20 mM dem Medium zugesetzt wurde, stieg die PDH_a beträchtlich an (Abb. 7). Nach 80 min war die PDH_a auf etwa 60 % der Gesamtaktivität angehoben, die ihrerseits

Abb.7 EINFLUSS VON FRUCTOSE UND PYRUVAT AUF DIE INTERKONVERSION
DER PDH IN PERFUNDIERTEN LEBERN GEFÜTTERTER RATTEN



Es wurden 400 mg Fructose als Stoß gefolgt von einer Infusion von 200 mg/Std. bzw. 1 mMol Pyruvat als Stoß mit anschließender Infusion von 2 mMol/Std. zum Medium (Pfeil) nach 40 Min. Vorperfusion gegeben. (o) Kontrollen ohne Substrat, (●) Fructose, (+) Pyruvat. — PDH_a, --- PDH_{gesamt}

Abb.8 EINFLUSS VON OLEAT AUF DIE DURCH PYRUVAT ERHÖHTE PDH_a-
IN PERFUNDIERTEN LEBERN GEFÜTTERTER RATTEN



Pyruvat wurde wie bei Abb.7 angegeben dem Medium zugesetzt. Nach 80 Min. Perfusion wurden dann 200 μM Oleat zugegeben (Pfeil). Signifikanzen nach Student's t-Test gegenüber der Kontrollgruppe: *p < 0.001, **p < 0.02. (●) Pyruvat, (○) Pyruvat + Oleat. — PDH_a, --- PDH_{gesamt}

durch Fructose nicht beeinflusst wurde. Ein ähnlicher Effekt wurde nach Zugabe von Pyruvat beobachtet. Wie in Abbildung 7 dargestellt, stieg hier der aktive Anteil der PDH innerhalb von 20 min bis auf 70 % der Gesamtaktivität an. Letztere blieb auch durch Pyruvat unbeeinflusst. In diesen Experimenten war ein Pyruvatspiegel von 10 mM im Perfusionsmedium eingestellt worden. Die Reversibilität des Effekts von Pyruvat auf die PDH_a konnte mit folgender Versuchsanordnung gezeigt werden: 30 min nach Pyruvatzugabe wurde das Perfusionsmedium gegen ein frisches Medium ohne Pyruvat ausgetauscht. Sofort nach diesem Austausch fiel die PDH_a auf den Wert der Vorperfusionsperiode ab.

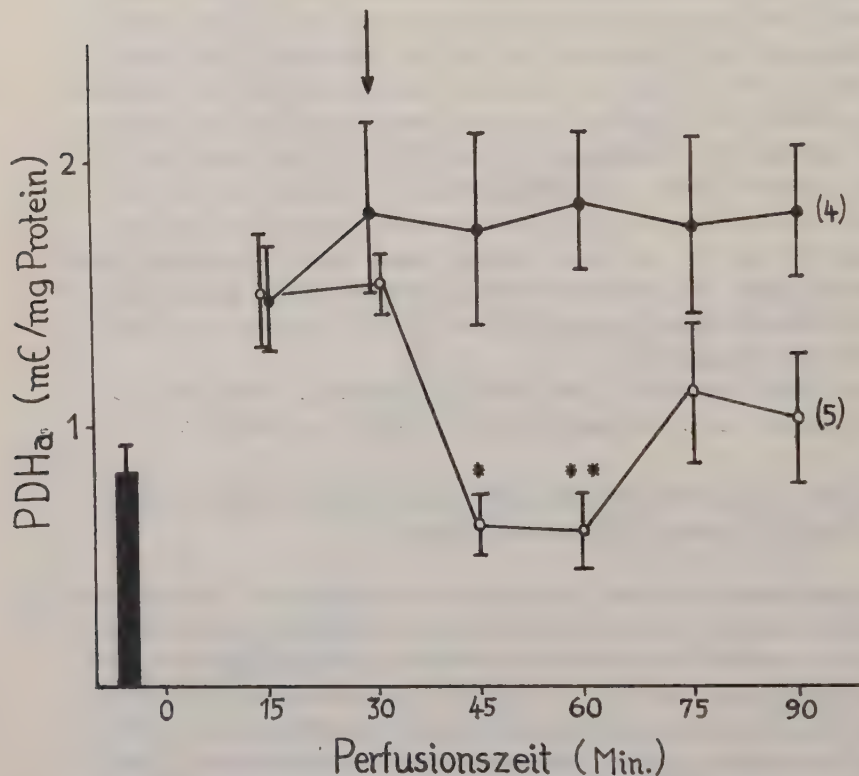
Wurde statt Pyruvat 10 mM Lactat eingesetzt, so zeigte die PDH_a einen viel geringeren Anstieg (Abb. 10, Tabelle 4).

Einfluß von Fettsäuren auf die Pyruvatdehydrogenase in perfundierten Lebern gefütterter Ratten

In Abbildung 8 ist der Einfluß von Fettsäuren auf den aktiven Anteil der PDH in der perfundierten Leber dargestellt. Nach 40 min Vorperfusion wurde dem Medium 10 mM Pyruvat zugesetzt, um den Spiegel der PDH_a zu erhöhen. Nach weiteren 40 min wurden dann $200\mu\text{Mol}$ in Albuminlösung emulgiertes Oleat (49) in das Medium gegeben. Daraufhin fiel die erhöhte PDH_a deutlich ab, während wiederum die Gesamtaktivität unbeeinflusst blieb. Acetat, in auf C_2 -Einheiten bezogenen äquimolaren Mengen wie Oleat, hatte keinen sicheren Effekt auf die PDH_a .

Aus der Tabelle 4 geht ferner hervor, daß Oleat auch die durch Fructose erhöhten PDH_a -Werte beeinflusst, d.h. daß ein weiterer Anstieg nach Oleatzugabe ausbleibt und die PDH_a wieder auf ihren Ausgangswert abfällt.

Abb.9 EINFLUSS VON d-(+)-DECANOYL-CARNITIN AUF DEN OLEAT-EFFEKT
AUF DIE PYRUVAT-DEHYDROGENASE



0.5 mMol Pyruvat wurden als Stoß mit anschließender Infusion von 1.8 mMol/Std. dem Medium zu Beginn der Perfusion zugesetzt. Nach 30 Min. (Pfeil) wurden dann 150 μ Mol Oleat als Stoß, gefolgt von einer Infusion von 600 μ Mol/Std. in das Medium gegeben (○). Die zweite Gruppe bekam zusammen mit der gleichen Menge Oleat 1 mM d-(+)-Decanoylcarnitin (●). Signifikanzen der Unterschiede nach Student's t-Test: * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$. Die Säule stellt den Mittelwert der PDH_a in ohne Substrat perfundierten Lebern dar.

AKTIVE PYRUVATDEHYDROGENASE (PDH_a) IN DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN LEBER UND SUBSTRATKONZENTRATIONEN IM MEDIUM AM ENDE DER PERFUSIONSPERIODE

Die Pyruvatdehydrogenase-Aktivität ist in mE/mg Protein, die Substratkonzentrationen im Medium sind in μ Mol/ml angegeben. Die Zahlen stellen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung dar.

Zugabe zum Perfusionsmedium	N	PDH _a	Pyruvat	Laktat	Ketonkörper (Acetacetat + Hydroxybutyrat)
Ohne Substrat perfundiert					
Lebern von gefütterten Ratten	6	0.99 $\pm$ 0.35	0.37 $\pm$ 0.06	2.45 $\pm$ 0.62	0.80 $\pm$ 0.08
Lebern von gehungerten Ratten	7	0.32 $\pm$ 0.11	0.06 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.05	2.74 $\pm$ 1.03
Lebern von gefütterten Ratten					
Glucose (40 mM)	3	1.04 $\pm$ 0.19	0.40 $\pm$ 0.15	5.23 $\pm$ 1.47	0.50 $\pm$ 0.07
Fructose (20 mM)	8	2.47 $\pm$ 0.31	1.38 $\pm$ 0.31	10.90 $\pm$ 1.24	1.24 $\pm$ 0.39
Pyruvat (10 mM)	6	2.98 $\pm$ 0.75	7.54 $\pm$ 3.74	9.00 $\pm$ 2.61	1.49 $\pm$ 0.42
Pyruvat (4 mM)	3	1.42 $\pm$ 0.18	3.81 $\pm$ 0.62	9.05 $\pm$ 1.34	1.32 $\pm$ 0.38
Lactat (10 mM)	6	1.46 $\pm$ 0.43	1.10 $\pm$ 0.18	12.36 $\pm$ 2.57	1.25 $\pm$ 0.64
Lebern gefütterter Ratten					
Fructose (20 mM) + Oleat x	6	1.07 $\pm$ 0.95	1.40 $\pm$ 0.21	10.80 $\pm$ 2.75	1.93 $\pm$ 0.43
Pyruvat (10 mM) + Oleat x	7	1.77 $\pm$ 0.74	12.15 $\pm$ 2.76	8.86 $\pm$ 2.93	1.99 $\pm$ 0.53
Pyruvat (4 mM) + Oleat xx	4	1.01 $\pm$ 0.52	4.58 $\pm$ 1.93	9.86 $\pm$ 2.93	2.54 $\pm$ 0.30
Pyruvat (4 mM) + Oleat					
+ d-(+)-Decanoylcarnitin (1mM)	5	1.78 $\pm$ 0.49	3.93 $\pm$ 0.61	9.14 $\pm$ 1.53	1.91 $\pm$ 0.29
Pyruvat (4 mM) + Acetat xxx	4	1.21 $\pm$ 0.33	3.37 $\pm$ 0.45	9.63 $\pm$ 2.01	2.09 $\pm$ 0.15

x 200 μ Mol Oleat wurden als Stoß dem Medium (Gesamtvolumen: 100 ml) zugesetzt

xx 150 μ Mol Oleat wurden als Stoß zugegeben mit anschließender Infusion von 600 μ Mol/Stunde

xxx 2 mMol Na-Acetat wurden als Stoß zugegeben mit anschließender Infusion von 4 mMol/Stunde

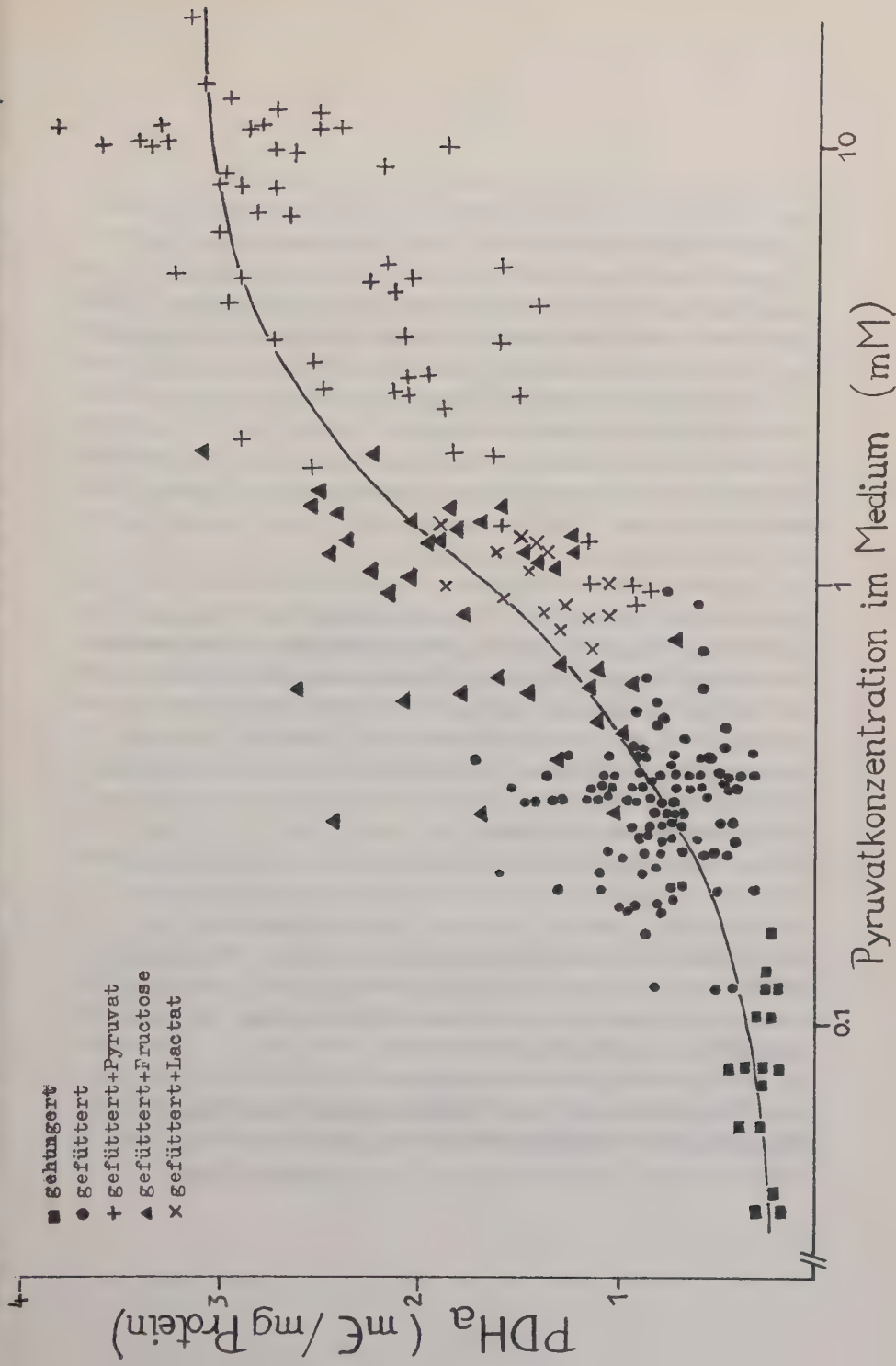
Um weiteren Einblick in den Wirkungsmechanismus von Fettsäuren auf die Interkonvertierung der PDH zu erhalten, wurde der Einfluß von d-(+)-Decanoylcarnitin, eines kompetitiven Hemmers der Acylcarnitintransferase (44), untersucht. Wie in Abbildung 9 dargestellt, wird der durch Oleat bedingte Abfall der PDH_a in Anwesenheit von 1 mM d-(+)-Decanoylcarnitin vollständig verhindert.

In Tabelle 4 sind für die verschiedenen Versuchsgruppen die am Ende der Perfusionsperiode gemessenen Werte der aktiven PDH in der Leber und die Konzentrationen von Pyruvat, Lactat und Ketonkörpern im Perfusionsmedium zusammengestellt.

DISKUSSION

Aus den hier beschriebenen Untersuchungen wird deutlich, daß das Verhältnis der ineinander konvertierbaren aktiven und inaktiven Form der Pyruvatdehydrogenase in der perfundierten Rattenleber in Abhängigkeit von dem angebotenen Substrat verändert werden kann. Das unterschiedliche Ansprechen des Systems auf die verschiedenen Substrate (Tabelle 4) läßt sich in Beziehung setzen zum Grad der Umsetzung dieser Substrate zu Pyruvat durch die Leber, gemessen an der Pyruvatkonzentration im Medium. Wenn diese Konzentrationen gegen die gleichzeitig bestimmten PDH_a -Werte in der Leber aufgetragen werden, so ergibt sich eine exponentielle Abhängigkeit zwischen diesen beiden Parametern (Abb. 10). Dabei liegt die Pyruvatkonzentration im Medium, die zu einem halb-maximalen Anstieg der PDH_a führt, ungefähr bei 1 mM. An isolierten Lebermitochondrien fand sich eine ähnliche Abhängigkeit, allerdings lag

Abb. 10. BEZIEHUNG ZWISCHEN DER PYRUVATKONZENTRATION IM MEDIUM UND DER PDH_a IN DER LEBER.



hier der halb-maximale Effekt schon bei 0.3 mM Pyruvat (45). Untersuchungen *in vitro* an gereinigter PDH zeigten, daß Pyruvat das Enzym vor der ATP-abhängigen Inaktivierung schützt (1, 2, 6). Es ist deshalb wahrscheinlich, daß in der perfundierten Leber der gleiche Mechanismus für den Anstieg der PDH_a auf Pyruvat hin verantwortlich ist. Eine Erhöhung der PDH_a nach intraperitonealer Verabreichung von Fructose wurde von Söling *et al.* (30) berichtet. Die Autoren schrieben dies dem Abfall der Konzentration an ATP in der Leber nach Fructose zu. Andererseits könnte aber auch die Fructose über ihre Umwandlung zu Pyruvat auf das PDH-System wirken (Abb. 10).

Zur Ergänzung der in Teil I beschriebenen Beobachtungen am Ganztier zeigen die Perfusionsexperimente mit Fettsäuren noch direkter deren Einfluß auf die Interkonvertierung der PDH. Um den Abfall der PDH_a nach Fettsäureangebot zu verdeutlichen, wurde der Spiegel der PDH_a zuvor mit Pyruvat bzw. Fructose angehoben. Aus Tabelle 4 geht hervor, daß die Fettsäuren offensichtlich nicht über eine Erniedrigung der Pyruvatkonzentration wirken.

Aus der Tatsache, daß in Gegenwart von d-(+)-Decanoylcarнитin der Oleateffekt ausblieb (Abb. 9), ergibt sich, daß offenbar die Oxydation von Oleat für die Wirkung auf die PDH notwendig ist. Acetat dagegen hatte keinen deutlichen Einfluß auf den Anteil an aktiver PDH, obwohl es von der Leber aufgenommen wurde, wie der starke Anstieg der Ketonkörperbildung zeigt (Tab. 4).

Die hier gezeigte substratabhängige Interkonversion der Pyruvatdehydrogenase in der perfundierten Leber könnte von physiologischer Bedeutung für die Regulation der Gluconeogenese und der Lipidsynthese aus Kohlenhydraten sein.

Fructose wird in wesentlich größerem Umfang zu Triglycerid-Fettsäuren und CO_2 metabolisiert als gleiche Mengen Glucose (46, 31). Dies kann durch die beschriebenen Beobachtungen erklärt werden, denen zufolge Fructose, im Gegensatz zu Glucose, den aktiven Anteil der PDH und damit das Angebot an Acetyl-CoA als Substrat für die Synthese von Fettsäuren steigert. Diese Erklärung beruht weiterhin auf der diskutierten Annahme (Teil I), daß die Pyruvatdehydrogenase-Reaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Umwandlung von Kohlenhydraten in Fettsäuren in der Leber darstellt.

Die beschriebenen Experimente lassen auch einige frühere Studien über die Gluconeogenese in der perfundierten Leber in einem neuen Licht erscheinen. Wurde Lactat als Substrat für die Glucosesynthese angeboten, so betrug das Verhältnis verbrauchte C_3 -Einheiten/gebildete Glucose etwa 2-2.5 (47, 48, 49), bei Angebot von Pyruvat dagegen 4 (48, 50). Dieser Unterschied läßt sich mit dem hier beschriebenen unterschiedlichen Einfluß von Pyruvat und Lactat auf die Interkonversion der PDH erklären, d.h. im Falle von Pyruvat passiert mehr Substrat den Pyruvatdehydrogenaseschritt und wird damit der Gluconeogenese entzogen.

Es wurde ferner gezeigt, daß nach Zugabe von Fettsäuren ein größerer Anteil des Pyruvats zu Glucose synthetisiert wird (38, 50, 51). Auch hierfür liefern die beobachteten Veränderungen im Interkonvertierungssystem der PDH eine Erklärung. Daneben könnte aber auch eine direkte Hemmung der Leber-Pyruvatdehydrogenase durch Acetyl-CoA (7), wie ursprünglich für das Enzym in Herzmuskel beschrieben (41), eine

Rolle spielen. Fettsäuren stimulieren andererseits auch die Gluconeogenese aus Lactat. Da hier der Quotient C_3 /Glucose bereits normalerweise den Wert 2 erreicht, scheidet ein solcher "Spar"-Mechanismus v i a PDH als Ursache aus.

In Teil I dieser Arbeit wurde auch über einen Anstieg der PDH_a in Lebern mit Insulin behandelte Ratten berichtet. Alle Versuche, eine ähnliche Wirkung von Insulin auch an der perfundierten Leber zu demonstrieren, gingen indes fehl. Das trifft auch für Glucagon zu, für das eine ähnliche Wirkung wie für Oleat zu erwarten gewesen wäre. Da andererseits verschiedene andere Stoffwechselereignisse in der perfundierten Leber durch Insulin und Glucagon deutlich beeinflußt werden, erscheint es zweifelhaft, daß diese beiden Hormone direkt an der Regulation der PDH v i a Interkonversion in der Leber beteiligt sind. Aus diesen und anderen Experimenten an isolierten Mitochondrien (45) erscheint eher die metabolische Situation für das Verhältnis von aktiver zu inaktiver PDH entscheidend zu sein, wobei Pyruvat auf der einen und Fettsäuren (oder möglicherweise noch andere Metabolite) auf der anderen Seite als Antagonisten wirken. Zweifellos liegen die wirksamen Konzentrationen von Pyruvat über dem zu erwartenden physiologischen Bereich. Unter Berücksichtigung des Modellcharakters der isoliert perfundierten Leber spricht dies jedoch nicht gegen eine regulatorische Rolle von Pyruvat i n v i v o.

LITERATUR

1. Linn, T.C., Pettit, F.H., and Reed, L.J.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 62 (1969) 234
2. Wieland, O., and v. Jagow-Westermann, B.,
Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 3 (1969) 271
3. Linn, T.C., Pettit, F.H., Hucho, F., and Reed, L.J.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 64 (1969) 227
4. Wieland, O., and Siess, E.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 65 (1972), Europ. J. Biochem. 26, 96
6. Siess, E., Wittmann, J., and Wieland, O.
Z. physiol. Chem. 352 (1971) 447
7. Wieland, O., Proceedings of the 7th Congress of the
Internat. Diabetes Federation. Buenos Aires, Aug. 1970.
(Excerpta Medica, Amsterdam) im Druck.
8. Wieland, O., Siess, E., and Schulze-Wethmar, F.H.,
1st Int. Sympos. Metab. Interconversion of Enzymes,
S. Margherita (Italy) 18 - 20 May 1970, Abstr., p. 52
9. Wieland, O., Siess, E., Schulze-Wethmar, F.H., v. Funcke,
H.J., and Winton, B.
Arch. Biochem. Biophys. 143 (1971) 593
10. Wieland, O., v. Funcke, H.J., and Löffler, G.,
Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 15 (1971) 295
11. Jungas, R.C., Metabolism, 20 (1971) 43
12. Weiss, L., Löffler, G., Schirmann, A., and Wieland, O.,
Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett., 15 (1971) 229
13. Coore, H.G., Denton, R.M., Martin, B.R., and Randle, P.J.,
Biochem. J., 123 (1971) 38 P
14. Wieland, O., Patzelt, C., and Löffler, G.,
2. Intern. Donausymposium über Diabetes mellitus,
Budapest 24.-26. Juni 1971 (J. Magyar and A. Beringer eds).
Verlag d. Wiener Med. Akademie, p. 585

15. Schweet, R.S., and Cheslock, K., J. Biol. Chem., 199
(1952) 749
16. Scriba, P., and Holzer, H., Biochem. Z. 334 (1961) 473
17. Tabor, H., Mehler, A.h., and Stadtman, E.R.,
J. Biol. Chem 204 (1953) 127
18. Wieland. O., v. Jagow-Westermann, B., and Stukowski, B.,
Z. physiol. Chem. 350 (1969) 329
19. Kahle, K., Weiss, L., Klarwein, M., and Wieland, O.,
Z. Anal. Chem. 252 (1970) 228
20. Duncombe, W.G., Biochem. J. 88 (1966) 7
21. Guder, W., Weiss, L., and Wieland, O.,
Biochem. Biophys. Acta 187 (1969) 173
22. Weiss L., unveröffentlicht
23. Bode, Ch., and Klingenberg, M.,
Biochem. Z. 341 (1965) 271
24. Patzelt, C., Löffler, G., and Wieland, O.,
Proceedings of the 1st Europ. Meeting on the Technique of
Perfusion of Isolated Liver and its Application
(Milan, 15.-17. July 1971) RAVEN Press (New York) im Druck
25. Böttger, J., Wieland, O., Brdiczka, D., and Pette, D.,
Europ. J. Biochem. 8 (1969) 113
26. Glogner, P., and Schurek, H.J., Z. klin. Chem. u. klin.
Biochem., 7 (1969) 590
27. Williamson, J.R., Scholz, R., and Browning, E.T.,
J. Biol. Chem. 244 (1969) 4617
28. Lowenstein, J.M., J. Biol. Chem. 246 (1971) 629
29. Boxer, G.E., and Shonk, C.E., in Advances in Enzyme
Regulation, (Edited by G Weber) Pergamon Press,
New Xork, Vol. 4, p. 107.
30. Söling, H.D. and Bernhard, G.
Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 13 (1971) 201

31. Pereira, J.N., and Jangaard, N.O.,
Metabolism, 20 (1971) 392
32. Patzelt, C., unveröffentlicht
33. Nikkilä, E.A., in Advances in Lipid Research,
Akademic Press (New York and London), Vol. 7 (1969) p.63
34. Walter, P., Paetkau, V., and Lardy, H.A.,
J. Biol. Chem. 241 (1966) 2533
35. Bremer, J., Biochem. Biophys. Acta, 116 (1966) 1.
36. Nicholls, D.G., Shepherd, D., and Garland, P.B.
Biochem. J. 103 (1967) 677
37. V. Jagow, G., Westermann, B., and Wieland, O.,
Europ. J. Biochem. 3, (1968) 512
38. Teufel, H., Menahan, L.A., Shipp, J.C., Böning, S., and
Wieland, O., Europ. J. Biochem. 2 (1967) 182
39. Haft, D.E., Biochem. Biophys. Acta 90 (1964) 173
40. V. Funcke, H.J., unveröffentlicht.
41. Garland, P.B., and Randle, P.J., Biochem. J. 91 (1964) 6 C
42. Wieland, O., Patzelt, C., and Löffler, G., (1972) Europ. J.
Biochem, 26 426
43. Bremer, J., (1968) Biochem. Prep. 12, 69
44. Fritz, J.B., and Marquis, N.R. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA
58 790
45. Portenhauser, R. and Wieland, O.H. in Vorbereitung
46. Wyshak, G.H. and Chaikoff, I.L. (1953) J. Biol. Chem. 200. 851
47. Hems, R., Ross, B.D., Berry, N., and Krebs, H.A. (1966)
Biochem J. 101, 284
48. Williamson, J.R., Browning, E.T., and Scholz, R. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 4607
49. Fröhlich, J. and Wieland, O. (1972) European J. Biochem. 19, 557
50. Menahan, L.A. and Wieland, O. (1969) European J. Biochem. 9, 182
51. Menahan, L.A., Ross, B.D., and Wieland, O. (1957) 3. Konf.
Ges. Biol. Chem., Oestrich, Springer-Verlag Berlin, p. 142

Herrn Prof. Dr. O. Wieland als Leiter des Instituts für Diabetesforschung in München und Herrn Privat-Dozent Dr. G. Löffler als Leiter der Biochemischen Abteilung danke ich für die Bereitstellung bester Arbeitsmöglichkeiten sowie ihre wissenschaftliche Anleitung und ständige Förderung der vorgelegten Arbeit. Den Damen Renate Weiss und Ursula Zechmeister danke ich für ihre sorgfältige technische Assistenz. Die Arbeit wurde unterstützt durch die Stiftung Volkswagenwerk und die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

LEBENS LAUF

Am 17. November 1941 wurde ich als 3. Sohn des Studienrates Georg Patzelt und seiner Ehefrau Luzia, geb. Seidel in Gleiwitz in Oberschlesien geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Einbeck von 1948 - 1952 wechselte ich zu dem dortigen Gymnasium über, wo ich 1961 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1961 begann ich das Studium der Medizin an der Universität in Saarbrücken, das ich im Sommersemester 1962 in Marburg fortsetzte.

Nach der ärztlichen Vorprüfung wechselte ich zur Universität München über, wo ich 1967 das Studium mit dem Staatsexamen beendete.

Ab 1.5.1967 arbeitete ich als Medizinalassistent.

1969 nahm mich Herr Prof. Wieland in die neu gegründete Forschergruppe Diabetes auf. Die hier vorgelegte Arbeit entstand im Rahmen meiner Tätigkeit in dieser Gruppe.

